

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-168860

(P2002-168860A)

(43) 公開日 平成14年6月14日 (2002. 6. 14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	G 2 G 0 4 5
A 6 1 B 10/00		A 6 1 B 10/00	D 2 G 0 5 4
G 0 1 N 1/10		G 0 1 N 1/10	V 2 G 0 5 9
21/27		21/27	C
21/78		21/78	C
審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-364241(P2000-364241)

(22) 出願日 平成12年11月30日 (2000. 11. 30)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年12月2日  
日本唾液腺学会主催の「第四十五回日本唾液腺学会」に  
おいて文書をもって発表

(71) 出願人 391012279

富山大学長

富山県富山市五福3190番地

(71) 出願人 000135036

ニプロ株式会社

大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号

(74) 上記2名の代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(71) 出願人 000010076

ヤマハ発動機株式会社

静岡県磐田市新貝2500番地

(74) 上記1名の代理人 100088904

弁理士 庄司 隆 (外1名)

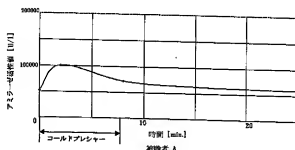
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレスの判定方法および判定装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ストレスをかけずに唾液を採取し、唾液中の生理活性物質を簡便に測定して、被験者のストレスを判定する方法および該方法に使用する装置を提供する。

【解決手段】 唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を指標とし、負荷ストレスを判定する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】被験者の唾液中に存在する $\alpha$ -アミラーゼ活性を指標にすることを特徴とする被験者のストレス判定方法。

【請求項2】被験者からストレスをかけることなく採取された唾液を検体とする、請求項1に記載のストレス判定方法。

【請求項3】前記唾液は、被験者から毛細管現象を利用して採取したものである、請求項1または2に記載のストレス判定方法。

【請求項4】被験者の安静時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性値を基準値とし、測定時の値と基準値との差異によってストレスの大きさを判定する請求項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。

【請求項5】測定時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性値が、基準値より大きければ不快なストレス(distress)の大きさを、基準値より小さければ快適なストレス(eustress)の大きさを判定する請求項4のストレス判定方法。

【請求項6】被験者の唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性の経時変化における時間勾配によってストレスの大きさを判定する請求項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。

【請求項7】正の時間勾配の大きさから不快なストレス(distress)の大きさを、負の時間勾配の大きさから快適なストレス(eustress)の大きさを判定する請求項6に記載のストレス判定方法。

【請求項8】被験者の唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性の経時変化において、安静時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性の値を基準値とし、精神的または肉体的なストレスを加えた後、基準値に復帰するまでの時間の長さにより被験者が反応するストレスの大きさを判定する請求項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。

【請求項9】 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することを可能とするセンサ部を備えた請求項1～8の何れか1に記載のストレス判定方法に使用するストレス判定装置。

【請求項10】毛細管現象により唾液を採取可能な機能を備えた請求項9に記載のストレス判定装置。

【請求項11】唾液の採取にあたり、センサ部を口腔内に挿入することが出来、連続的な測定を可能とする請求項10に記載のストレス判定装置。

【請求項12】少なくとも2つの電極、 $\alpha$ -アミラーゼの基質膜を含む電気化学センサを備えた請求項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

【請求項13】さらに追隨酵素（共役酵素）を担持する固定化酵素膜を含む請求項12に記載のストレス判定装置。

【請求項14】少なくとも $\alpha$ -アミラーゼ反応により生成する色素、または $\alpha$ -アミラーゼおよび追隨酵素（共役酵素）の反応により生成する色素を認識する化学セン

サを備えた請求項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

【請求項15】さらに追隨酵素（共役酵素）を担持する固定化酵素膜を含む請求項14に記載のストレス判定装置。

【請求項16】少なくとも $\alpha$ -アミラーゼの基質または抗体、発光素子、受光素子および光反射面を担持する、表面プラズモン共鳴を利用するセンサを備えた請求項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は簡便なストレス判定方法に関し、特に、被験者の唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を指標とするストレス判定方法、および該方法に使用する装置に関する。

**【0002】**

【従来の技術】近年、社会が複雑になるにつれて、人々が受けるストレスは種々であって多大なものがある。様々なストレスを受けた人々が各種疾患にかかり、その対処法にも複雑な治療が要求されている。これらのストレスの治療に先立ち、ストレスの程度を判定することは医療分野において大きな重要性を占めるものと考えられる。

【0003】これまでのストレスの判定方法は、生体に精神的または肉体的苦痛のいずれもが全く与えられないことが必要であるため、利用可能な手法はかなり限定されていた。一般に用いられる方法としては心拍数や血圧を測定することが挙げられる。しかし、これらの方法は一過性のものであり、長期的に続くストレスの判定方法としては採用することができなかった。

【0004】また、血液中のコルチゾールなどの副腎皮質ホルモンやアドレナリン、ノルアドレナリンなどの神経伝達物質が、それらが本来もつ生理作用のほかにストレスを反映する指標となることがよく知られている。しかし、血液中の成分では、血液の採取それ自体にストレスが伴うという致命的な欠点があるばかりでなく、ホルモン等の濃度は非常に低いので分析には大型の装置が必要であり、測定には長時間を要している。

【0005】また、唾液中の生理活性物質では、例えば、唾液中のコルチゾール濃度を測定する慢性ストレス判定法（特許第3108765号公報）、唾液中の副腎性ステロイドおよび／またはその代謝物の濃度を指標とするストレス定量法（特開平11-38004号公報）、唾液中のデヒドロエピアンドロステロン濃度を測定するストレス鑑定法（特開平11-326318号公報）、および血液、尿または唾液中の各種指標物質から快・不快ストレス状態を解析する方法（特開2000-131318号公報）などが提案されている。

【0006】しかしながら、唾液中の指標を採取すること、血液を採取する場合に比べて、簡単な手法を使う

ことができ、簡便ではあるが、指標である生理活性物質の測定は、一般的な診断用試薬に比べて、高価な薬剤を使用するか、あるいは手法が複雑であり、一般化することは困難である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、簡便に、容易に判定可能なストレス判定方法を提供することにより、また、その判定に使用する簡便な装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために、種々鋭意検討したところ、唾液中の $\alpha$ -アミラーゼに注目し、ストレスがかかった被験者では $\alpha$ -アミラーゼ活性が高いことを見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明は被験者から唾液を採取し、該唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定し、該活性から被験者のストレスの程度を判定することを特徴とするストレス判定方法、および $\alpha$ -アミラーゼ活性測定可能なセンサ部を有するストレス判定装置である。

【0009】本発明は、

1. 被験者の唾液中に存在する $\alpha$ -アミラーゼ活性を指標にすることを特徴とする被験者のストレス判定方法。
2. 被験者からストレスをかけることなく採取された唾液を検体とする、前項1に記載のストレス判定方法。
3. 前記唾液は、被験者から毛細管現象を利用して採取したものである、前項1または2に記載のストレス判定方法。
4. 被験者の安静時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性値を基準値とし、測定時の値と基準値との差異によってストレスの大きさの程度を判定する前項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。
5. 測定時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性値が、基準値より大きければ不快なストレス(distress)の大きさの程度を、基準値より小さければ快適なストレス(eustress)の大きさの程度を判定する前項4のストレス判定方法。
6. 被験者の唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性の経時変化における時間勾配によってストレスの大きさの程度を判定する前項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。
7. 正の時間勾配の大きさから不快なストレス(distress)の大きさの程度を、負の時間勾配の大きさから快適なストレス(eustress)の大きさの程度を判定する前項6に記載のストレス判定方法。
8. 被験者の唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性の経時変化において、安静時の唾液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性の値を基準値とし、精神的または肉体的なストレスを加えた後、基準値に復帰するまでの時間の長さにより被験者が反応するストレスの大きさの程度を判定する前項1～3の何れか1に記載のストレス判定方法。
9.  $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することを可能とするセンサ部を備えた前項1～8の何れか1に記載のストレス

判定方法に使用するストレス判定装置。

10. 毛細管現象により唾液を採取可能な機能を備えた前項9に記載のストレス判定装置。

11. 唾液の採取にあたり、センサ部を口腔内に挿入することが出来、連続的な測定を可能とする前項10に記載のストレス判定装置。

12. 少なくとも2つの電極、 $\alpha$ -アミラーゼの基質膜を含む電気化学センサを備えた前項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

13. さらに追随酵素（共役酵素）を担持する固定化酵素膜を含む前項12に記載のストレス判定装置。

14. 少なくとも $\alpha$ -アミラーゼ反応により生成する色素、または $\alpha$ -アミラーゼおよび追随酵素（共役酵素）の反応により生成する色素を認識する化学センサを備えた前項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

15. さらに追随酵素（共役酵素）を担持する固定化酵素膜を含む前項14に記載のストレス判定装置。

16. 少なくとも $\alpha$ -アミラーゼの基質または抗体、発光素子、受光素子および光反射面を担持する、表面プラズモン共鳴を利用するセンサを備えた前項9～11の何れか1に記載のストレス判定装置。

【0010】

【発明の実施態様】（唾液の採取）本発明において唾液の採取は、被験者の身体または精神にストレスをかけることなく行う。特に、唾液の採取量は微量で十分であるので、被験者にストレスを与えることなく短時間で採取できるものが望ましい。さらに、唾液の採取には、毛細管現象を利用して採取することが好ましい。

【0011】唾液を採取する器具としては、図1-Aに示される器具（キャピラリー）が例示される。該器具の構造は、唾液を毛細管現象で吸引可能とするために、同一形状のフィルム3枚を使用し、中央に溝を形成した毛細管形成板を配して両側から溝のない上板と下板で挟み込む構造を有し、採取口と試験紙との間に細い溝を構成する。一般にプラスチックフィルムは撥水性を有しているため、2枚の溝のない含む内側には、例えばエタノールで5%に希釈した界面活性剤（例えば、DKエステル、しよ糖脂肪酸エステル、：第一工業製薬株式会社）を塗布、乾燥させてある。

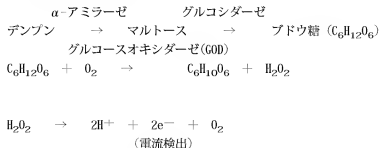
【0012】また、採取器具は口腔内に挿入するためにディスプレイ式とする必要があることから、使用材料は低廉なポリエチレンフィルムのみを使用してもよい。1枚当たりのフィルムの厚さは30 $\mu$ mとし、超音波溶着で接合形成する。

【0013】図1-Aに示される器具の先端部1を被験者の歯溝に接触させると、毛細管現象により先端部から溝2にそって、唾液が採取される。唾液は試験紙3に染み込み、数秒間で約10 $\mu$ lの唾液が採取される。

【0014】図1-Bには、被験者から唾液を採取する

態様が示され、上記器具にて唾液を採取し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定試薬により発色あるいは発光させた上記器具を光学的測定計に挿入して、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定する。また、 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定のためのセンサ部分を直接口腔内に挿入することにより、連続的に測定でき、身体に受けるストレスをリアルタイムで判定することが可能となる。本発明によるストレス判定装置では、毛細管現象を利用して微量の唾液を瞬時に採取できるように採取部を備えることが好ましい。

【0015】( $\alpha$ -アミラーゼ活性の計測) ストレス判定の指標となる $\alpha$ -アミラーゼの酵素活性測定には、す



【0017】前記基質がデンプンである場合、生成したマルトースに $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させ、さらに生成したグルコースに、グルコースオキシダーゼを作用させ、生成した過酸化水素からの電子または酸素をセンサにより検出する。

【0018】本発明において使用するセンサとして、例えば、図2に示す構造を有する酵素固定化膜を備えた電極がある。このセンサは、過酸化水素電極上に固定化グルコースオキシダーゼ膜、固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ膜を順次積層してなる。唾液中の $\alpha$ -アミラーゼは基質であるデンプンに作用して、2～数個のマルトオリゴ糖に分解され、さらに $\alpha$ -グルコシダーゼの作用により、グルコースが生成する。グルコースはグルコースオキシダーゼの作用により過酸化水素を生成し、この過酸化水素を電極にて測定する。図2の下に各記号により各物質を明示した。

【0019】電極としては、酵素電極のほかに、酵素FETセンサ、酵素フォトダイオード、オプロード型センサまたは表面プラズモン式センサなどが利用できる。また、これらのセンサは小型化が可能であり、携帯可能なサイズにすることにより唾液を採取した現場で短時間に $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することができる。

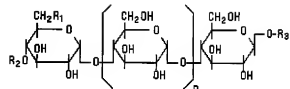
【0020】また、 $\alpha$ -アミラーゼの基質としては、デンプンの他にグルコース単位で構成されるマルトオリゴ糖であって、その非還元性末端グルコースがグルコース以外の置換基で修飾されている、かつ/または還元性末端グルコースの1位位置において検出可能な色素等を結合しているマルトオリゴ糖などが使われる。具体的には、下記の一般式よりなる修飾マルトオリゴ糖が $\alpha$ -アミラーゼの基質となり得る。

【0021】

でに公知となっている測定法が利用できるが、特に酵素センサ等の技術により短時間で簡便に測定することが好ましい。具体的には、唾液中の $\alpha$ -アミラーゼを基質に作用させ、必要により追跡酵素(共役酵素)を作用させて生成した該酵素反応生成物を検出して、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定する。前記基質としては、デンプンまたはオリゴ糖、およびこれらの誘導体などがある(臨床検査提要改定版第31版622～626頁)。

【0016】本発明の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定の一例を下記反応式にて示す。

【化1】



【0022】式中の $R_1$ 、 $R_2$ はそれぞれ水素原子あるいは保護基により修飾されていてもよい。保護基は格別限定されるものではないが、例えば、非置換または置換の低級アルキル基、低級アルコシル基またはフェニル基、アジド基、ハロゲン原子、N-モノアルキルカルバモイルオキシ基、アルキル若しくはアリールスルホニルオキシ基またはアルキルオキシ基、 $\alpha$ -グルコシル基、 $\alpha$ -マルトシル基、 $\beta$ -ガラクトシル基であり、 $R_1$ 、 $R_2$ は互いに架橋していてもよく、該架橋基にはさらに置換基を有していてもよい。 $R_3$ は水素原子あるいはシグナル発生基例えば光学的にシグナルを検出可能な基(好適には発色性芳香族基)であり、 $n$ は0～5である。上記式では $-OR_3$ は、還元性末端グルコースの1位に $\beta$ -結合したものであるが、 $\alpha$ -結合したものであってもよい。

【0023】このようなマルトオリゴ糖の例としてより具体的には、p-ニトロフェニル-マルトペンタオース、2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペンタオース、2-クロロ-p-ニトロフェニル-マルトペンタオース、4-ニトロフェニルベンジル- $\alpha$ -マルトペンタオースなども使用可能である。

【0024】 $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定には、デンプン等の基質から $\alpha$ -アミラーゼにより生成したマルトオリゴ糖に $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させ、生成したグルコースにNADの存在下にグルコースデヒドロゲナーゼを

作用させて、NADHを測定することも可能である。

【0025】(反応条件)本発明の $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、採取された唾液濃度は概ねそのまま測定に付される。基質濃度は、自体公知の最適濃度を使用される。通常は0.05mM~1M程度の濃度になるように調製される。反応温度は、特に限定されないが、好ましくは約25~40℃である。反応時間は、1~10数分で十分であるが、基質および共役酵素の種類に依存する。反応至適pHは特に限定されないが、所望により適当な緩衝液でpH6~8に調節しても良い。さらに、所望により、反応の促進のために、公知の $\alpha$ -アミラーゼの活性化剤を用いてもよい。

【0026】(ストレス判定装置)本発明のストレス判定装置は、 $\alpha$ -アミラーゼ酵素活性測定可能なセンサ部を有する。本発明において使用する唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を簡便に測定することができるセンサとは、

(1)少なくとも2つの電極と $\alpha$ -アミラーゼの基質、必要により追随酵素(共役酵素)( $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、グルコースオキシダーゼなど)を含む電気化学センサ、(2)少なくとも $\alpha$ -アミラーゼ基質(例えば、p-ニトロフェニルマルトリオシド)から $\alpha$ -アミラーゼ反応により生成する色素(例えばp-ニトロフェノール)、または $\alpha$ -アミラーゼ基質(例えばデンプン)から $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコースオキシダーゼの反応により生成した過酸化水素に、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアニリン類またはフェノール類を反応させて生成する色素を認識する化学センサ、(3)少なくとも $\alpha$ -アミラーゼ基質、発光素子、受光素子および光反射面を担持する、表面プラズモン共鳴を利用するセンサ等が含まれる。なお、追随酵素(共役酵素)は、固定化されていることが好ましい。

【0027】図12には電気化学的センサの構造を示す。絶縁性を有する材料で形成されたベース表面には、電極1、電極2が形成されている。ベースの材質としては、樹脂フィルムもしくはカーボンなどが利用できる。また、これらの電極の形成にはエッチング、スクリーン印刷、もしくは電極シートの接着固定にいずれの方法を用いても本発明の効果には影響ない。

【0028】該電極1および2の先端上面には、アミラーゼに対する基質を充分に含んだ基質膜が形成されている。該基質膜の基材には、カルボキシメチルセルロース(CMC)、セルロース、その他の他人に無害な蛋白などの高分子化合物が用いられる。そして、基質膜で覆われない部分は水濡れによる短絡を防ぐために保護用カバーが設けられている。

【0029】該電気化学センサを口腔内に挿入すると、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の計測に記載したように唾液に含まれる $\alpha$ -アミラーゼが基質膜の基質の分解を促進して所定の化学反応が進み、その結果として $\alpha$ -アミラーゼ

濃度に応じた電流が計測されるものである。すなわち、本電気化学センサを用いれば、連続的に唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することが可能となる。ここで、このような電気化学的センサでは、それを形成する部材は生体安全性の確認されたもののみで構成することが可能であり、安全上も何等问题ない。

【0030】次に、図13には表面プラズモン共鳴を利用するセンサの構造を示す。該センサは表面の一方に金属薄膜が形成されたガラス基板と、LEDやレーザーなどの光源と、受光素子、ガラス基板の金属薄膜が形成されていない面に形成されたブリズム、および金属薄膜上に固定されたリガンドから構成されている。 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定する場合には、このリガンドとして基質または抗体を固定化する。

【0031】採取された唾液検体が流路を経由してセンサ表面に至ると、該 $\alpha$ -アミラーゼ活性に応じて光の屈折率が変化し、その結果、受光素子で受け取る光の位置が変化する。この差から、唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することができる。本センサでは金属薄膜上に固定化されるリガンドにもともと生体内に存在する化学物質のみを使用することができるので、流路は必須要件ではなく、該センサを直接、口腔内に挿入することも可能である。

【0032】(ストレスの判定方法)本発明におけるストレスとは、肉体的ストレス、精神的ストレスのいずれも包含する。本発明のストレス判定法は、唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ量、特に酵素活性により判定する。

【0033】具体的には、被験者の安静時に採取した唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定し、その活性値を記録、記憶して基準値とする。然る後に被験者の任意の状態における $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定し、安静時に記録、記憶した基準値と比較する。基準値より酵素活性が小さければ、不快なストレス(distress)を受けていると判定し、小さければ、快適なストレス(eustress)を受けていると判定できる。また、基準値との差が大きければ、受けているストレスも大きく、身体または精神に受けているストレスの程度も判定できる。

【0034】また、連続して $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定することにより経時的なストレスの変化を捉えることができる。不快なストレスを受けると唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性が上昇する。この際の正の時間勾配の大きさによってストレスの大きさの程度を判定することができる。逆に快適なストレスを受けている場合は $\alpha$ -アミラーゼの酵素活性が低下するので、負の時間勾配として現れ、同様にその大きさの程度も判定できる。

【0035】更には経時的に $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定し、測定時間内に加えられた任意のストレスによる酵素活性変化を捉え、ストレス負荷前値(基準値)に戻るまでの時間・変化の大きさからストレスの大きさの程度を判定することができる。

## 【0036】

【実施例】以下、本発明を実施例を用いて詳細に説明する。

## 【0037】

【実施例1】任意に選出した4名の被験者を用いて、コールドプレッシャーテストを実施し、ストレスの判定を試みた。コールドプレッシャーテストとは、片手を手首のところまで氷水の入った容器に30秒間浸し、その後容器から手を出し30秒間休む。これを7回繰り返すことでストレスをかけるテストである。

【0038】図3～6に結果を示す。横軸はコールドプレッシャーテストを開始してからの経過時間を示しており、コールドプレッシャーの実施中および実施後に数回唾液を採取した。縦軸は採取した唾液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性値を表している。コールドプレッシャーすなわちストレスにより $\alpha$ -アミラーゼの酵素活性が上昇し、コールドプレッシャーの終了後は低下していることがわかる。

【0039】被験者によって $\alpha$ -アミラーゼの活性値や変動の仕方が異なるが、これは被験者によってストレスと感ずる程度が異なる、つまり感性の違いが現れている。被験者Aに比べ被験者Bではコールドプレッシャーテストから受けるストレスの程度が小さいことがわかる。また、プレッシャーを止められるということから快感（喜び）を感じ、コールドプレッシャーの終了後急激に $\alpha$ -アミラーゼ活性が下がる場合も考えられる。被験者Cがこの例にあたり、他の被験者と異なりコールドプレッシャーの終了後すぐにテスト開始時の値にまで $\alpha$ -アミラーゼの活性値が戻っている。ストレスから開放されたことによる快感が作用していることが示されている。

## 【0040】

【実施例2】任意に選出した2名の被験者を用いて、クレベリントテストを実施し、ストレスの判定を試みた。クレベリントテストとは、心理検査の一手法として考案されている筆記試験で、一桁の数値が並んでいる用紙を用いて被験者に足し算を連続して行わせる、精神的苦痛を与えるストレス負荷試験である。

【0041】図7～8に結果を示す。図3～6と同様に横軸にクレベリントテスト開始からの経過時間、縦軸に $\alpha$ -アミラーゼの活性値である。こども、実施例1と同様にクレベリントテストすなわちストレスにより $\alpha$ -アミラーゼの活性値が上昇し、クレベリントテストが終了すると $\alpha$ -アミラーゼの活性値は低下した。

## 【0042】

【実施例3】任意に選出した1名の被験者を用いて、ミラードローイングテストを実施し、ストレスの判定を試みた。ミラードローイングテストとは、自分の手を直接見られない様に仕切りを立て、鏡に映った像を見ながら

所定の経路をペンで描かせるストレス負荷試験である。本試験では、二重の星型の線が印刷された用紙を用い、線の間をはみ出さない様にペンで描かされた。はみ出したらもう一度スタート地点からやり直すというペナルティを与え、5分間継続させた。

【0043】図9に結果を示す。横軸にミラードローイングテスト開始からの経過時間、縦軸に $\alpha$ -アミラーゼの活性値である。実施例1、2と同様にミラードローイングテストすなわちストレスにより $\alpha$ -アミラーゼの活性値が上昇し、ミラードローイングテストが終了すると $\alpha$ -アミラーゼの活性値は低下した。

## 【0044】

【実施例4】任意に選出した2名の被験者を用いて、穿刺テストを実施し、ストレスの判定を試みた。これは、血糖測定用の針を用いて指先を自ら穿刺させることによりストレスを与えるテストである。

【0045】図10～11に結果を示す。図10では穿刺を実施後 $\alpha$ -アミラーゼ活性値が上昇した。また、図11では穿刺の指示により $\alpha$ -アミラーゼ活性値が上昇し、穿刺の実施時にはすでに $\alpha$ -アミラーゼ活性値が上昇していた。

## 【0046】

【実施例5】任意に選出した1名の被験者を用いて、クレベリントテスト実施後のリラクゼーション効果の判定を試みた。これは、精神的ストレス負荷であるクレベリントテストを実施後に、座位または仰臥位の姿勢をとってもらい、またはマッサージを受けてもらうことによるリラクゼーション効果との関係を見ることで、快適なストレス（eustress）の大きさを判定するものである。

【0047】図14～16および表1に結果を示す。図14ではクレベリントテスト実施後に座位をとってもらった場合、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値はゆっくり下降した。図15ではクレベリントテスト実施後に仰臥位をとってもらった場合、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値は座位に比べ早く下降した。図16ではクレベリントテスト実施後にマッサージを受けてもらった場合、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値は速やかに下降した。また図14、15、16では $\alpha$ -アミラーゼ活性値の上昇および下降の経時変化をみるために $\alpha$ -アミラーゼ活性値の時間勾配を求めたが、クレベリントテストで正の時間勾配を、リラクゼーションで負の時間勾配を示した。以上の結果を表1にまとめたが、表1では、快適なストレス（eustress）により、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値が安静時の値に復帰するまでの時間が短縮し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値の経時変化における時間勾配が急激な負の勾配を呈した。

## 【0048】

【表1】

	α-ミラーゼ濃度 (U/l)		時間 (min.)		勾配 (U/l・min.)		
	安静時	最大値	最大値まで	復帰まで	最大値	最小値	ピーク10ピーク
座位	250.56	649.27	8	29			
仰臥位	334.08	576.59	12	24	50.02	— 33.19	83.21
仰臥位+ マッサージ	292.32	693.24	13	20	49.24	— 95.07	144.31

表1 ストレスおよびリラクゼーションによる  
α-ミラーゼ活性値の変動

【0049】

【発明の効果】上記したごとく本発明によれば、ストレスをかけずに唾液を採取し唾液中α-ミラーゼ活性を測定することで、その場で短時間にストレスを判定する技術を確立することができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは唾液採取部および色原体を有する化学センサ（器具）を示す分解図であり、Bは被験者から唾液を採取し、計測計に該器具を挿入する態様を示す図である。図中①は先端部、②は溝、③は試験紙、1は測定孔（直径1.6mm）、2は上板（ポリエステル）、3は毛细管形成板（ポリエステル）、4は下板（ポリエステル）、5は界面活性剤を意味する。

【図2】α-ミラーゼ活性測定に用いる固定化酵素膜を有する酵素センサの構造を示す図である。各記号の意味は図中に示した。

【図3】

【図4】

【図5】

【図6】コールドプレッシャーテストによるα-ミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図7】

【図8】クレベリンテストによるα-ミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図9】ミラードローイングテストによるα-ミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図10】

【図11】穿孔テストによるα-ミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図12】電気化学センサの構造を示す図である。

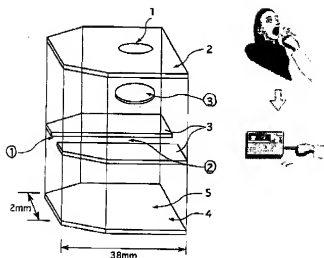
【図13】表面プラズモン共鳴を利用するセンサの構造を示す図である。図中、逆Y字白抜きは固定化されたリガンド、白抜き丸は被測定物質を意味する。

【図14】

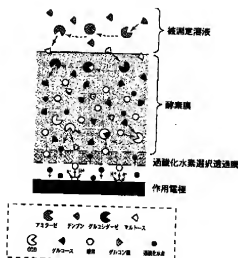
【図15】

【図16】クレベリンテスト実施後のリラクゼーション効果の変動を示す表である。

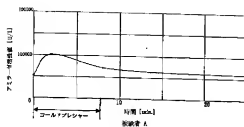
【図1】



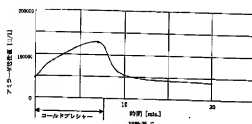
【図2】



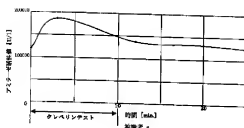
【図3】



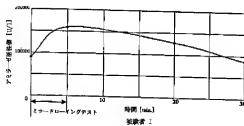
【図5】



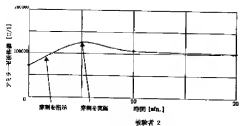
【図7】



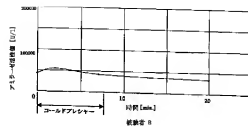
【図9】



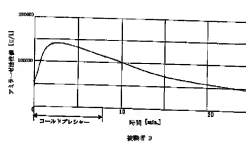
【図11】



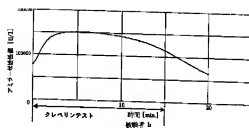
【図4】



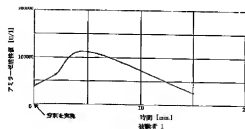
【図6】



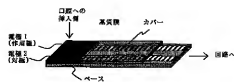
【図8】



【図10】

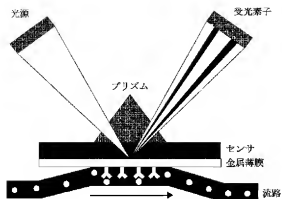


【図12】

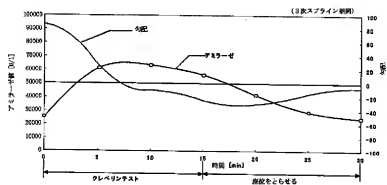




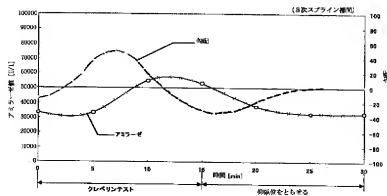
【図13】



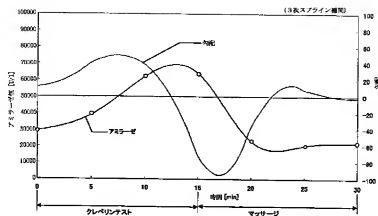
【図14】



【図15】



【図16】



## 【手続補正書】

【提出日】平成13年2月22日（2001. 2. 22）

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】上図は唾液採取部および色原体を有する化学センサ（器具）を示す分解図であり、下図は被験者から唾液を採取し、計測計に該器具を挿入する態様を示す図である。

【図2】 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定に用いる固定化酵素膜を有する酵素センサの構造を示す図である。各記号の意味は図中に示した。

【図3】コールドプレッシャーテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図4】コールドプレッシャーテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図5】コールドプレッシャーテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図6】コールドプレッシャーテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図7】クレバリンテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図8】クレバリンテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値

の変動を示す表である。

【図9】ミラードローイングテストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図10】穿刺テストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図11】穿刺テストによる $\alpha$ -アミラーゼ活性値の変動を示す表である。

【図12】電気化学センサの構造を示す図である。

【図13】表面プラズモン共鳴を利用するセンサの構造を示す図である。図中、逆Y字白抜きは固定化されたリガンド、白抜き丸は被測定物質を意味する。

【図14】クレバリンテスト実施後のリラクゼーション効果の変動を示す表である。

【図15】クレバリンテスト実施後のリラクゼーション効果の変動を示す表である。

【図16】クレバリンテスト実施後のリラクゼーション効果の変動を示す表である。

【符号の説明】

①：先端部

②：溝

③：試験紙

1：測定孔（直径1.6mm）

2：上板（ポリエステル）

3：毛細管形成板（ポリエステル）

4：下板（ポリエステル）

5：界面活性剤

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	S
		33/52	C
	5 9 5	33/543	5 9 5
		33/68	
(72)発明者	山口 昌樹 〒939-8046 富山市本郷新60-2 ファミ ールひらい201	F ターム (参考)	2G045 AA25 AA40 CB07 DA20 FA11 FB01 FB03 FB05 GC12 HA06 HA14 JA06
(72)発明者	吉田 博 〒531-8510 大阪市北区本庄西3丁目9 番3号 株式会社ニッショー内		2G054 AA06 AB02 AB07 CA28 CE01 EA06 FA31 FB01 GA03 GB01 GB04 2G059 AA05 BB12 BB13 EE02 FF04 GG01 GG02 JJ12 KK01